

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

<b>Date of mailing</b> (day/month/year) 12 April 2000 (12.04.00)	
<b>International application No.</b> PCT/JP99/05080	<b>Applicant's or agent's file reference</b> SNOW-128
<b>International filing date</b> (day/month/year) 17 September 1999 (17.09.99)	<b>Priority date</b> (day/month/year) 17 September 1998 (17.09.98)
<b>Applicant</b> GOTO, Masaaki et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

17 March 2000 (17.03.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer Diana Nissen</p> <p>Telephone No.: (41-22) 338.83.38</p>
--	--

**PCT**  
**NOTIFICATION OF TRANSMITTAL**  
**OF COPIES OF TRANSLATION**  
**OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY**  
**EXAMINATION REPORT**

(PCT Rule 72.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

FUJINO, Seiya  
Mitsuhama Building  
8th floor  
2-1, Yotsuya 1-chome  
Shinjuku-ku  
Tokyo 160-0004  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 17 January 2001 (17.01.01)	
Applicant's or agent's file reference SNOW-128	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
International application No. PCT/JP99/05080	International filing date (day/month/year) 17 September 1999 (17.09.99)
Applicant SNOW BRAND MILK PRODUCTS CO., LTD. et al	

**1. Transmittal of the translation to the applicant.**

The International Bureau transmits herewith a copy of the English translation made by the International Bureau of the international preliminary examination report established by the International Preliminary Examining Authority.

**2. Transmittal of the copy of the translation to the elected Offices.**

The International Bureau notifies the applicant that copies of that translation have been transmitted to the following elected Offices requiring such translation:

EP,AU,CA,CN,NO,NZ,US

The following elected Offices, having waived the requirement for such a transmittal at this time, will receive copies of that translation from the International Bureau only upon their request:

HU,JP,KR,ZA

**3. Reminder regarding translation into (one of) the official language(s) of the elected Office(s).**

The applicant is reminded that, where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report.

It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned (Rule 74.1). See Volume II of the PCT Applicant's Guide for further details.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer Eliott Peretti Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

10T

特 許 協 力 条 約

PCT

REC'D 01 MAY 2000

WIPO

PCT

## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 SNOW-128	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/05080	国際出願日 (日.月.年) 17.09.99	優先日 (日.月.年) 17.09.98
国際特許分類(IPC) IntCl <sup>7</sup> A61K38/17, A61K38/22, A61P3/04		
出願人(氏名又は名称) 雪印乳業株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。  <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。  I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 17.03.00	国際予備審査報告を作成した日 13.04.00	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 新留 豊	4C 9639
電話番号 03-3581-1101 内線 3452		

様式PCT/IPEA/409(表紙)(1998年7月)

## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語
3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)

請求の範囲

1

有

請求の範囲

無

進歩性(I S)

請求の範囲

1

有

請求の範囲

無

産業上の利用可能性(I A)

請求の範囲

1

有

請求の範囲

無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1: WO, 95/24411, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.),  
14. 9月. 1995 (14. 09. 95)

## 説明:

文献1の第3頁第7行-第4頁第3行には、スタンニオカルシン(Stanniocalcin)の製造方法、及びそれを用いた治療用途、例えば、電解質の異常(electrolyte disorders)、あるいは骨粗鬆症(osteoporosis)やページェット病(Paget's disease)等について開示されている。

しかしながら、スタンニオカルシンを用いて肥満の予防、あるいは治療を行うことについては、文献1には記載も示唆もされていない。また、文献1に記載の疾患と肥満を関連づける文献もない。

したがって、請求の範囲1に係る発明は文献1からは当業者に自明でなく、進歩性を有する。

請求の範囲1に記載の発明は、産業上の利用可能性を明らかに有する。

ST  
2007  
**Translation**

PATENT COOPERATION TREATY

**PCT**

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference <b>SNOW-128</b>	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. <b>PCT/JP99/05080</b>	International filing date (day/month/year) <b>17 September 1999 (17.09.99)</b>	Priority date (day/month/year) <b>17 September 1998 (17.09.98)</b>
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC <b>A61K 38/17, 38/22, A61P 3/04</b>		
Applicant <b>SNOW BRAND MILK PRODUCTS CO., LTD.</b>		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.
- ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand <b>17 March 2000 (17.03.00)</b>	Date of completion of this report <b>13 April 2000 (13.04.2000)</b>
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

**I. Basis of the report****1. With regard to the elements of the international application:\***

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

**2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.**

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

**3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:**

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

**4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:**

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

**5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\***

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1	YES
	Claims		NO

**2. Citations and explanations**

Document 1: WO, 95/24411, A1 (Human Genome Sciences, Inc.) 14 September 1995 (14.09.95)

**Commentary:**

Page 3, line 7 to page 4, line 3 of document 1 discloses a process for the preparation of stanniocalcin and a method of therapy using the same for the treatment of electrolyte disorders, osteoporosis, Paget's disease and the like.

However, document 1 neither describes nor implies preventing or treating obesity by using stanniocalcin. In addition, there are no documents linking the diseases described in document 1 to obesity.

As a result, the invention described in Claim 1 is not obvious to persons skilled in the art from the description in document 1 and therefore does appear to involve an inventive step.

The invention described in Claim 1 clearly has industrial applicability.

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 1999年09月16日 (16.09.1999) 木曜日 18時09分08秒

0	受理官庁記入欄	
0-1	国際出願番号	
0-2	国際出願日	
0-3	(受付印)	
0-4	この特許協力条約に基づく国際出願願書(様式 - PCT/RO/101)は、右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.84 (updated 01.06.1999)
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。	
0-6	出願人によって指定された受理官庁	日本国特許庁 (RO/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記号	SNOW-128
I	発明の名称	肥満予防及び／又は治療剤
II	出願人	出願人である (applicant only)
II-1	この欄に記載した者は	米国を除くすべての指定国 (all designated States except US)
II-2	右の指定国についての出願人である。	
II-4ja	名称	雪印乳業株式会社
II-4en	Name	SNOW BRAND MILK PRODUCTS CO., LTD.
II-5ja	あて名:	065-0043 日本国 北海道 札幌市 東区苗穂町6丁目1番1号
II-5en	Address:	1-1, Naebocho 6-chome, Higashi-ku Sapporo-shi, Hokkaido 065-0043 Japan
II-6	国籍 (国名)	日本国 JP
II-7	住所 (国名)	日本国 JP
III-1	その他の出願人又は発明者	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-1-1	この欄に記載した者は	米国のみ (US only)
III-1-2	右の指定国についての出願人である。	
III-1-4ja	氏名(姓名)	後藤 雅昭
III-1-4en	Name (LAST, First)	GOTO, Masaaki
III-1-5ja	あて名:	329-05 日本国 栃木県 下都賀郡石橋町 下古山456-1
III-1-5en	Address:	456-1, Shimokoyama, Ishibashi-machi Shimotsuga-gun, Tochigi 329-05// Japan
III-1-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-1-7	住所 (国名)	日本国 JP



## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本 (出願用) - 印刷日時 1999年09月16日 (16. 09. 1999) 木曜日 18時09分08秒

III-2 III-2-1 III-2-2 III-2-4ja III-2-4en III-2-5ja III-2-5en III-2-6 III-2-7	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は 右の指定国についての出願人である。 氏名 (姓名) Name (LAST, First) あて名:  Address:   国籍 (国名) 住所 (国名)	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)  友保 昌拓 TOMOYASU, Akihiro 329-0519 日本国 栃木県 下都賀郡石橋町 大松山 1-3-3 SKマンション 3-E SK-Mansion 3-E, 1-3-3, Omatsuyama, Ishibashi-machi Shimotsuga-gun, Tochigi 329-0519 Japan 日本国 JP 日本国 JP
III-3 III-3-1 III-3-2 III-3-4ja III-3-4en III-3-5ja III-3-5en III-3-6 III-3-7	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は 右の指定国についての出願人である。 氏名 (姓名) Name (LAST, First) あて名:  Address:   国籍 (国名) 住所 (国名)	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)  山口 京二 YAMAGUCHI, Kyoji 330-0006 日本国 埼玉県 大宮市 島町 702-12 ライオンズガーデン東大宮 1-524 Lionsgarden Higashiomiya 1-524, 702-12, Shimacho Omiya-shi, Saitama 330-0006 Japan 日本国 JP 日本国 JP
III-4 III-4-1 III-4-2 III-4-4ja III-4-4en III-4-5ja III-4-5en III-4-6 III-4-7	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は 右の指定国についての出願人である。 氏名 (姓名) Name (LAST, First) あて名:  Address:   国籍 (国名) 住所 (国名)	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)  木野崎 雅彦 KINOSAKI, Masahiko 329-0528 日本国 栃木県 河内郡上三川町 ゆうきが丘 53-8 53-8, Yuukigaoka, Kaminokawa-machi Kawachi-gun, Tochigi 329-0528 Japan 日本国 JP 日本国 JP

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 1999年09月16日（16.09.1999）木曜日 18時09分08秒

III-5 III-5-1 III-5-2 III-5-4ja III-5-4en III-5-5ja  III-5-5en  III-5-6 III-5-7	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は 右の指定国についての出願人である。 氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名:  Address:  国籍(国名) 住所(国名)	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)  中川 信明 NAKAGAWA, Nobuaki 329-0415 日本国 栃木県 下都賀郡国分寺町 川名子3 1-1 ハイツサカエ E201 Heights Sakae E201, 31-1, Kawanago, Kokubunji-machi Shimotsuga-gun, Tochigi 329-0415 Japan 日本国 JP 日本国 JP
IV-1  IV-1-1ja IV-1-1en IV-1-2ja  IV-1-2en  IV-1-3 IV-1-4 IV-1-5	代理人又は共通の代表者、通知のあて名 下記の者は国際機関において右記のごとく出願人のために行動する。 氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名:  Address:  電話番号 ファクシミリ番号 電子メール	代理人 (agent)  藤野 清也 FUJINO, Seiya 160-0004 日本国 東京都 新宿区 四谷1丁目2番1号 三浜ビル8階 Mitsuham Bldg. 8F, 2-1, Yotsuya 1-chome, Shinjuku-ku, Tokyo 160-0004 Japan 03 3226 6671 03 3226 6673 syfujino@red.an.egg.or.jp
V V-1	国の指定 広域特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	EP: AT BE CH&LI DE DK ES FI FR GB IE IT LU NL SE 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国
V-2	国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	AU CA CN HU JP KR NO NZ US ZA
V-5	指定の確認の宣言 出願人は、上記の指定に加えて、規則4.9(b)の規定に基づき、特許協力条約のもとで認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、V-6欄に示した国の指定を除く。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。	
V-6	指定の確認から除かれる国	なし (NONE)

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

SNOW-128

原本（出願用） - 印刷日時 1999年09月16日（16.09.1999）木曜日 18時09分08秒

VI-1	先の国内出願に基づく優先権主張		
VI-1-1	先の出願日	1998年09月17日（17.09.1998）	
VI-1-2	先の出願番号	10-263004	
VI-1-3	国名	日本国 JP	
VI-2	優先権証明書送付の請求 上記の先の出願のうち、右記の番号のものについては、出願書類の認証謄本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁に対して請求している。	VI-1	
VII-1	特定された国際調査機関 (ISA)	日本国特許庁 (ISA/JP)	
VIII	照合欄	用紙の枚数	添付された電子データ
VIII-1	願書	5	-
VIII-2	明細書（配列表を除く）	9	-
VIII-3	請求の範囲	1	-
VIII-4	要約	1	snow128abstract.txt
VIII-5	図面	0	-
VIII-6	明細書の配列表	5	-
VIII-7	合計	21	
VIII-8	添付書類	添付	添付された電子データ
VIII-8	手数料計算用紙	✓	-
VIII-9	別個の記名押印された委任状	✓	-
VIII-11	記名押印（署名）の説明書	✓	-
VIII-14	寄託した微生物又は生物材料に関する書面	✓	-
VIII-15	計算機読取可能な媒体によるマルチメディア及び/又はアミノ酸配列リスト		別個のフレキシブルディスク
VIII-16	PCT-EASYディスク	-	フレキシブルディスク
VIII-17	その他	優先権書類送付	-
VIII-17	その他	納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面	-
VIII-18	要約書とともに提示する図の番号		
VIII-19	国際出願の使用言語名:	日本語 (Japanese)	
IX-1	提出者の記名押印		
IX-1-1	氏名(姓名)	藤野 清也	

## 受理官庁記入欄

10-1	国際出願として提出された書類の実際の受理の日	
10-2	図面:	
10-2-1	受理された	
10-2-2	不足図面がある	
10-3	国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であってその後期間内に提出されたものの実際の受理の日（訂正日）	
10-4	特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日	

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

SNOW-128

原本（出願用） - 印刷日時 1999年09月16日（16. 09. 1999）木曜日 18時09分08秒

10-5	出願人により特定された国際調査機関	ISA/JP
10-6	調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない	

## 国際事務局記入欄

11-1	記録原本の受理の日	
------	-----------	--

特許協力条約に基づく国際出願願書(願書付属書－  
手数料計算用紙)

SNOW-128

原本(出願用) - 印刷日時 1999年09月16日 (16. 09. 1999) 木曜日 18時09分08秒

[この用紙は、国際出願の一部を構成せず、国際出願の用紙の枚数に算入しない]

0	受理官庁記入欄		
0-1	国際出願番号		
0-2	受理官庁の日付印		
0-4	(付属書) この特許協力条約に基づく国際出願願書付属書(様式 - PCT/RO/101(Annex))は、右記によって作成された。		PCT-EASY Version 2.84 (updated 01.06.1999)
0-9	出願人又は代理人の書類記号		SNOW-128
2	出願人		雪印乳業株式会社
12	所定の手数料の計算	金額/係数	小計(JPY)
12-1	送付手数料 T	⇒	18,000
12-2	調査手数料 S	⇒	77,000
12-3	国際手数料 基本手数料 (最初の30枚まで) b1	54,800	
12-4	30枚を越える用紙の枚数	0	
12-5	用紙1枚の手数料 (X)	1,300	
12-6	合計の手数料 b2	0	
12-7	b1 + b2 = B	54,800	
12-8	指定手数料 国際出願に含まれる指定国数	11	
12-9	支払うべき指定手数料の数 (上限は10)	10	
12-10	1指定当たりの手数料 (X)	12,600	
12-11	合計の指定手数料 D	126,000	
12-12	PCT-EASYによる料金の減額 R	-16,900	
12-13	国際手数料の合計 (B+D-R) I	⇒	163,900
12-14	優先権証明書請求手数料 優先権証明書を請求した数	1	
12-15	1優先権証明書当たり の手数料 (X)	1,500	
12-16	優先権証明書請求手数料 の合計 P	⇒	1,500
12-17	納付すべき手数料の合計 (T+S+I+P)	⇒	260,400
12-19	支払方法	送付手数料: 特許印紙 調査手数料: 特許印紙 国際手数料: 銀行口座への振込み 優先権証明書請求手数料: 特許印紙	

EASYによるチェック結果と出願人による言及

13-2-2	EASYによるチェック結果 指定国	Green? より多くの指定が可能です。確認してください。
--------	----------------------	----------------------------------

		Green? EP特許で指定から外された国がありますが、よろしいですか?
13-2-3	EASYによるチェック結果 氏名(名称)	Green? 出願人 1: 電話番号が記入されていません。
		Green? 出願人 1: ファクシミリ番号が記入されていません。
13-2-5	EASYによるチェック結果 生物	Green? 寄託された生物材料: PCT締約国によっては、寄託された生物材料の特徴に関する情報を出願時に明細書に記載することを義務づけている国がありますので、確認してください。
13-2-6	EASYによるチェック結果 内訳	Green? 国際出願に図面が含まれていませんが、よろしいですか?
		Green? 寄託された生物材料: PCT締約国によっては、寄託された生物材料の特徴に関する情報を出願時に明細書に記載することを義務づけている国がありますので、確認してください。
13-2-7	EASYによるチェック結果 手数料	Green? 使用されている料金表が最新のものであるかどうか、確認してください。
13-2-10	EASYによるチェック結果 受理官庁/国際事務局記入欄	Green? この願書を作成したPCT-EASYは英語版ないし西欧言語版以外のWindows上で動作しています。ASCII文字以外の文字について、願書と電子データを注意して比較してください。



0-1	寄託された微生物又はその他の生物材料に関する表示 (PCT規則13の2)(様式 - PCT/RO/134(EASY))は、 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.84 (updated 01.06.1999)
0-1-1		
0-2	国際出願番号	
0-3	出願人又は代理人の書類記号	SNOW-128
1	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
1-1	記載頁	6
1-2	行	2
1-3	寄託の表示	
1-3-1	寄託機関の名称	通商産業省・工業技術院生命工学技術研究所(NIBH)
1-3-2	寄託機関のあて名	日本国 〒305-0046 茨城県つくば市東1丁目1-3
1-3-3	寄託の日付	1999年05月31日 (31.05.1999)
1-3-4	受託番号	NIBH FERM BP-6736
1-4	追加の表示	なし (NONE)
1-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国
1-6	追加事項の表示の届け出 右記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。	なし (NONE)

## 受理官庁記入欄

0-4	この用紙は国際出願とともに受理した (はい/いいえ)	
0-4-1	権限のある職員	

## 国際事務局記入欄

0-5	この用紙が国際事務局に受理された日	
0-5-1	権限のある職員	

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い  
発行される。

## 原寄託についての受託証

氏名 (名称) 雪印乳業株式会社 生物科学研究所  
寄託者 所長 宮田 信夫

あて名 〒

栃木県下都賀郡石橋町大字下石橋字花林  
519 番地

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF  
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF  
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL  
DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this  
page.

殿

### 1. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)

DH5 $\alpha$ /pCEP-STC

(受託番号)

FERM BP- 6736

### 2. 科学的性質及び分類学上の位置

1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

- ☐ 科学的性質  
☐ 分類学上の位置

### 3. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 10 年 8 月 11 日 (原寄託日) に受領した 1 欄の微生物を受託する。

### 4. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、平成 10 年 8 月 11 日 (原寄託日) に 1 欄の微生物を受領した。  
そして、平成 11 年 5 月 31 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。  
(平成 10 年 8 月 11 日に寄託された微工研菌寄第 P- 16933 号より移管)

### 5. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名称: National Institute of Bioscience and Human-Technology  
Agency for Industrial Science and Technology

所長 大箸 信一

Dr. Shinichi Oshichi Director-General

あて名: 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305-8566)

1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken  
305-8566, JAPAN

平成 11 年 (1999) 5 月 31 日

(Translation)

INTERNATIONAL FORM

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION  
OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE  
PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL  
DEPOSITARY AUTHORITY identified at the bottom  
of this page.

TO DEPOSITOR:

Name: Research Institute of Life Science  
Snow Brand Milk Products Co., Ltd.  
General Manager: Nobuo MIYATA  
Address: 519 Aza Hanabayashi, Ohaza Shimoishibashi,  
Ishibashi-Cho, Shimotsuga-gun, Tochigi-ken,  
329-05, JAPAN

I. IDENTIFICATION OF MICROORGANISM

Identification Reference Given  
by the Depositor:  
DH5  $\alpha$  /pCEP-STC

Acession Number:  
FERM BP-6736

II. A SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC POSITION

The microorganism identified under I above was accompanied  
by a document stating the following item(s).

- ☐ A Scientific Property  
☐ Taxonomic position

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This authority accepts the microorganism identified under I  
above, which was received on August 11, 1998.

IV. RECEIPT OF TRANSFER

This authority received the microorganism identified under I  
above on August 11, 1998 and transfer of the deposit based on  
the Budapest Treaty on May 31, 1999  
(transferred from Bikoken No. P-16933, which was deposited on  
August 16, 1998)

V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: Natinal Institute of Bioscience and Human-Technology  
Agency of Industrial Science and Technology  
Ministry of International Trade and Industry

Representative: Ohashi Shinichi (Sealed)  
Dr., DIRECTOR GENERAL

Address: 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken  
305-8566, JAPAN

Date: May 31, 1999

E P



P C T

## 国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)  
〔PCT 18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 SNOW-128	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/05080	国際出願日 (日.月.年) 17.09.99	優先日 (日.月.年) 17.09.98
出願人 (氏名又は名称) 雪印乳業株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT 18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

IntCl<sup>6</sup> A61K38/17, A61K38/22

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

IntCl<sup>6</sup> A61K38/17, A61K38/22

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS, MEDLINE, Genbank/EMBL/DBJ/GenSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 95/24411, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.), 14. 9月. 1995 (14. 09. 95), 全文参照 & JP, 9-511140, A & US, 5837498, A & US, 5877290, A & EP, 750626, A1	1

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献  
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10. 12. 99

国際調査報告の発送日

11. 12. 99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

大宅 郁治



4C

9639

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP99/05080

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IntCl6 A61K38/17, A61K38/22

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IntCl6 A61K38/17, A61K38/22

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS, MEDLINE, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 95/24411, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.), 14 September, 1995 (14.09.95), Full text & JP, 9-511140, A & US, 5837498, A & US, 5877290, A & EP, 750626, A1	1

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
10 December, 1999 (10.12.99)Date of mailing of the international search report  
21 December, 1999 (21.12.99)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer



PCT

特許協定に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 A61K 38/17, 38/22</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/16795</p> <p>(43) 国際公開日 2000年3月30日(30.03.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/05080</p> <p>(22) 国際出願日 1999年9月17日(17.09.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/263004 1998年9月17日(17.09.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 雪印乳業株式会社 (SNOW BRAND MILK PRODUCTS CO., LTD.)[JP/JP] 〒065-0043 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号 Hokkaido, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 後藤雅昭(GOTO, Masaaki)[JP/JP] 〒329-0511 栃木県下都賀郡石橋町下古山456-1 Tochigi, (JP) 友保昌拓(TOMOYASU, Akihiro)[JP/JP] 〒329-0519 栃木県下都賀郡石橋町大松山1-3-3 SKマンション3-E Tochigi, (JP) 山口京二(YAMAGUCHI, Kyoji)[JP/JP] 〒330-0006 埼玉県大宮市島町702-12 ライオンズガーデン東大宮1-524 Saitama, (JP)</p>		<p>木野崎雅彦(KINOSAKI, Masahiko)[JP/JP] 〒329-0528 栃木県河内郡上三川町ゆうきが丘53-8 Tochigi, (JP) 中川信明(NAKAGAWA, Nobuaki)[JP/JP] 〒329-0415 栃木県下都賀郡国分寺町川名子31-1 ハイツサカエE201 Tochigi, (JP)</p> <p>(74) 代理人 藤野清也(FUJINO, Seiya) 〒160-0004 東京都新宿区四谷1丁目2番1号 三浜ビル8階 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AU, CA, CN, HU, JP, KR, NO, NZ, US, ZA, 欧州 特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, IE, IT, LU, NL, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54) Title: PREVENTIVES AND/OR REMEDIES FOR OBESITY</p> <p>(54) 発明の名称 肥満予防及び／又は治療剤</p> <p>(57) Abstract Novel preventives and/or remedies for obesity. These preventives and/or remedies contain as the active ingredient stanniocalcin. Because of having an excellent activity of inhibiting the differentiation and maturation of adipocytes, they are useful as drugs for preventing and/or treating obesity.</p>		

(57)要約

新規な肥満予防及び／又は治療剤を提供する。

スタンニオカルシンを有効成分とする肥満予防及び／又は治療剤。

優れた脂肪細胞分化、成熟抑制活性を有し、肥満予防及び／又は治療のための  
医薬として有用。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AL アルバニア	EE エストニア	LC セントルシア	SD スーダン
AM アルメニア	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AT オーストリア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SG シンガポール
AU オーストラリア	FR フランス	LR リベリア	SI スロヴェニア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LS レソト	SK スロヴァキア
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LT リトアニア	SL シエラ・レオネ
BB バルバドス	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BE ベルギー	GE グルジア	LV ラトヴィア	SZ スワジランド
BF ブルキナ・ファソ	GH ガーナ	MA モロッコ	TD チャード
BG ブルガリア	GM ガンビア	MC モナコ	TG トーゴ
BJ ベナン	GN ギニア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BR ブラジル	GW ギニア・ビサウ	MG マダガスカル	TZ タンザニア
BY ベラルーシ	GR ギリシャ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア 共和国	TM トルクメニスタン
CA カナダ	HR クロアチア	ML マリ	TR トルコ
CF 中央アフリカ	HU ハンガリー	MN モンゴル	TT トリニダード・トバゴ
CG コンゴ	ID インドネシア	MR モーリタニア	UA ウクライナ
CH スイス	IE アイルランド	MW マラウイ	UG ウガンダ
CI コートジボアール	IL イスラエル	MX メキシコ	US 米国
CM カメルーン	IN インド	NE ニジェール	UZ ウズベキスタン
CN 中国	IS アイスランド	NL オランダ	VN ヴェトナム
CR コスタ・リカ	IT イタリア	NO ノールウェー	YU ユーゴスラビア
CU キューバ	JP 日本	NZ ニュー・ジーズランド	ZA 南アフリカ共和国
CY キプロス	KE ケニア	PL ポーランド	ZW ジンバブエ
CZ チェコ	KG キルギスタン		



## 明 細 書

## 肥満予防及び／又は治療剤

技術分野

本発明は、新規な肥満予防及び／又は治療剤に関する。

本発明製剤は、肥満に対する優れた予防及び／又は治療効果を有し、医薬として有用である。

背景技術

肥満は、糖尿病、高血圧症、心臓病などのリスクファクターであり、先進国の国民の健康を脅かす存在である。肥満とは、脂肪組織が普通以上に蓄積した身体状況のことを言う。脂肪組織は、生体内の余剰エネルギーを脂肪、即ちトリグリセライドとして備蓄している特殊な器官であり、脂肪細胞、その前駆細胞を含む線維芽細胞、マクロファージ、血管周囲細胞、血液細胞などから構成されている。脂肪細胞は、脂肪組織に存在する細胞の1／3から2／3を占めると言われており、その細胞内に脂肪、即ちトリグリセライドを蓄積している。脂肪細胞は、間葉系の多能性幹細胞から、脂肪細胞としての素地を獲得した脂肪芽細胞、脂肪滴は出現していないが脂肪細胞の初期マーカーを有する前駆脂肪細胞、脂肪滴を有する未成熟脂肪細胞、脂肪が多量に蓄積した成熟脂肪細胞へと分化・成熟していくとされている。軽度の肥満成人の生体内では、個々の脂肪細胞が蓄積している脂肪、即ちトリグリセライド量が増加し細胞が肥大化している。肥満の程度が大きくなると脂肪細胞の数も増加する。従って、脂肪細胞への分化・成熟を抑制し脂肪細胞の数を減少させることや、成熟脂肪細胞の肥大化を抑制することにより、蓄積脂肪量の増加を抑制し肥満の進行を止め、肥満を治療することが期待される。生体内における脂肪細胞の分化制御は、食物摂取や運動などの環境因子などから派生する数多くの因子によって、正あるいは負に行われていることが明らかにされてきた。前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化を抑制するサイトカインとして、

腫瘍壊死因子- $\alpha$  ; (TNF- $\alpha$  : Torti F.M. et al., Science, Vol.229, p867 (1985))、トランスフォーミング増殖因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$  ; Ignotz R.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.82, p8530 (1985))、プレアディポサイトファクター-1 (Pref-1, Preadipocyte factor-1 : Smas C.M. et al., Cell, Vol.73, p725 (1993))などのサイトカインが報告されている。又、近年クローニングされたob遺伝子の翻訳蛋白質レプチンは、おそらくは中枢神経を介して摂食量や脂肪組織重量を減少させることが報告されている(Levin N. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 93, p1726, 1996)。さらには、強力な摂食促進作用を有する脳内ペプチド・ニューロペプチドYとそのレセプターも肥満を抑制する医薬品開発の強力なツールとして注目されている(Sainsburg A. et al. Diabetologia, Vol. 39, p353, 1996)。これらのサイトカインは、脂肪細胞における脂肪蓄積抑制作用による肥満の治療剤となることが期待され、レプチンなど上記のサイトカインの一部については、肥満の治療剤又は予防薬として臨床試験が進められている。

また現在、肥満の治療薬又は予防薬として、米国では既にレダックス(アメリカンホームプロダクツ社)が上市されている。又、メリディア(クノール社)やキセニカル(ロッシュ社)なども、米国において肥満の治療薬又は脂肪の吸収抑制薬として認可される見通しである。しかし、これらの薬剤を用いた治療法はその効果並びに治療結果において必ずしも満足できるものではなく、これらに代わるより有効性が高く副作用の少ない新しい治療薬の開発が望まれていた。

#### 発明の開示

本発明者らは、上述の状況に鑑み抗肥満作用あるいは肥満の改善作用を有する物質を求め鋭意探索の結果、従来ミネラル代謝を調節する蛋白質として知られているスタンニオカルシン(Stanniocalcin ; S T C : Olsen H.S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.93, p1792 (1996))が、脂肪細胞形成抑制活性、即ち脂肪細胞の分化及び又は成熟を抑制する活性を有するというスタンニオカルシ

ンの全く予想しなかった生理活性を見い出すに至った。従って本発明は、新規な物質を有効成分とする肥満予防及び／又は治療剤を提供することを課題とする。本発明は、スタンニオカルシンを有効成分とする、肥満予防及び／又は治療剤に関する。本発明製剤は、肥満に対する優れた予防及び／又は治療効果を有し、医薬として有用である。

スタンニオカルシンは最初魚類で発見され、その後ヒトを含む哺乳類にも存在することが明らかとなった。そして、構造の類似性を基に遺伝子工学的にヒト胎児胚の cDNA が単離された。ヒトスタンニオカルシンは、得られた cDNA を遺伝子工学的手法を用いて各種細胞に発現させることにより得ることができる。

スタンニオカルシンを魚に投与すると生体内のカルシウム量が低下すること、及びラットに投与するとリン酸の尿への排泄量が低下することが知られている (Proc. Natl. Aca. Sci. USA., 93, 1792 (1996))。しかし、スタンニオカルシンが肥満に対して優れた予防及び治療効果を有することは知られていない。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明の有効成分であるスタンニオカルシンは、Olsen H. S. らの方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 93, p1792 (1996)) により得ることができる。具体的には、上述の文献あるいはジーンバンク等を検索することにより、スタンニオカルシンの cDNA 配列を知ることができ、その配列情報に基づいて、PCR 法等を用いてスタンニオカルシンの cDNA を得ることができる。得られた cDNA を挿入した発現ベクターを動物細胞等にトランスフェクトして、スタンニオカルシン発現細胞を得ることができる。得られたスタンニオカルシン発現細胞を培養した培養液から常法により精製することにより、スタンニオカルシンを得ることができる。

脂肪細胞形成抑制活性は、Kodama H. らの方法 (Journal of Cellular Physiology, Vol. 112, p83 (1982))、即ち、マウス前駆脂肪細胞株を標的細胞として用い、デキサメタゾン存在下での脂肪細胞形成の抑制を、トリグリセライドの蓄積抑制で評価することにより確認できる。

本発明の有効成分であるスタンニオカルシンは、肥満の予防及び／又は治療を目的とした医薬組成物として、ヒト及び動物に対して安全に投与されるものである。スタンニオカルシンは、製剤化して経口的あるいは非経口的に投与することができる。医薬組成物の形態としては、注射用組成物、点滴用組成物、坐剤、経鼻剤、舌下剤、経皮吸収剤などが挙げられる。これらの製剤は、公知の製剤学的製法に準じ、製剤として薬理学的に許容され得る担体、賦形剤、安定剤、着色剤、界面活性剤、その他添加剤などを用いることにより、目的とする製剤とすることができる。注射用組成物の場合は、本発明の有効成分であるスタンニオカルシンの薬理学的有効量及び製剤学的に許容し得る賦形剤／賦活剤との混合物とし、その中にアミノ酸、糖類、セルロース誘導体、及びその他の有機／無機化合物などの一般的に注射用組成物に添加される賦形剤／賦活剤を用いても良い。必要に応じてpH調整剤、緩衝剤、安定化剤、可溶化剤などを添加し、常法によって各種注射剤とすることができる。

投与は、通常成人体重kg当たり $10\mu\text{g}$ ～ $10\text{mg}$ を一日数回に分けて経口的あるいは非経口的に投与する。特に好ましい投与形態は静脈内に投与することである。

### 実施例

以下の実施例をもって本発明をより詳細に説明するが、これらは単に例示するのみであり、これらによって本発明はなんら限定されるものではない。

#### 実施例 1

##### スタンニオカルシンの製造

i) IMR-90細胞（ヒト胎児肺繊維芽細胞 ATCC CCL-186）からのポリ(A) + RN

##### A の単離

ファストトラックmRNAアイソレーションキット（Invitrogen社）を用い、そのマニュアルに従って $1 \times 10^8$  個のIMR-90細胞より約 $10\mu\text{g}$  のポリ(A) + RNA を単離した。

ii) ヒトスタンニオカルシン発現ベクターの構築

単離したポリ(A)<sup>+</sup> RNA、1  $\mu$ g を鋳型としてスーパースクリプトII cDNA合成キット（ギブコ BRL社）を用いて、同社のプロトコールに従って一本鎖cDNAを合成し、このcDNAと、ヒトスタンニオカルシンの塩基配列よりデザインしたプライマーSTCF1N（配列表配列番号1）及びプライマーSTCR1Xh（配列表配列番号2）を用いて、PCRを行い、スタンニオカルシン(STC)cDNA断片を取得した。以下にPCRの条件を示す。

10X Ex Taqバッファー（宝酒造社）	10	$\mu$ l
2.5 mM dNTP	8	$\mu$ l
cDNA溶液	1	$\mu$ l
Ex Taq（宝酒造社）	0.5	$\mu$ l
蒸留水	74.5	$\mu$ l
20 $\mu$ M プライマーSTCF1N	5	$\mu$ l
100 $\mu$ M プライマーSTCR1Xh	1	$\mu$ l

上記の溶液を微量遠心チューブ中で混合後、以下の条件でPCRを行った。95℃で3分前処理後、95℃で30秒間、55℃で30秒間、72℃で2分間の3段階の反応を30回繰り返した後、70℃で5分間保温した。反応液の一部をアガロース電気泳動し約900bpの均一なDNA断片が得られたことを確認した。この断片を常法によりシーケンスし、スタンニオカルシンをコードするcDNAが得られたことを確認した。cDNA配列を配列表配列番号3に、アミノ酸配列を配列番号4にそれぞれ示す。

得られた約900bpのDNA断片を、QIAEXII DNA extraction kit（QIAGEN社）によって精製した。このDNA断片を制限酵素XhoIおよびNheI（宝酒造社）で切断し、QIAEXII DNA extraction kitにより精製した（STC XhoI-NheI断片）。このSTC XhoI-NheI断片を制限酵素XhoIおよびNheIで切断したpCEP4（Invitrogen社）に、ligation kit ver.2（宝酒造社）により結合させてプラスミドpCEPSTCを得た。このプラスミドは、スタンニオカルシンをコードするDNAを含んでいる。このプラスミドを含む大腸菌（DH5  $\alpha$ ；ギブコ BRL社）は、DH5  $\alpha$ /pCEP-STCとして平

成11年（1999年）5月31日に日本国茨城県つくば東1丁目1-3（郵便番号 305-8566） 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-6736として寄託されている。尚、PCR 由来の DNA部分に、DNA合成時における塩基の誤った取り込みがないことを、DNAシーケンシングにより確認した。

#### iii) ヒトスタンニオカルシンの発現

実施例1-ii) で得られたpCEPSTC を持つ大腸菌 DH5 $\alpha$ を、50  $\mu$ g/mlのアンピシリン（シグマ社）および4.7%のグリセロールを含むTerrific Broth（ライフテクノロジーズ社）2 ml中で37°C一晩振盪培養し、菌体からプラスミド DNAをQIAWELL kit（QIAGEN社）により精製した。293-EBNA細胞（Invitrogen社）を10%牛胎児血清を含むIMDM（ライフテクノロジーズ社）中  $2 \times 10^5$ /ウェル/ml となるように24ウェルプレートの各ウェルに播種し、37°C一晩、CO<sub>2</sub> インキュベーター（5% CO<sub>2</sub>）中で培養した。pCEPSTC あるいはpCEP4 をFugene6（ベーリンガー・マンハイム社）を用いて、293-EBNA細胞にトランスフェクトした。DNAは各 0.5  $\mu$ g、Fugene6 は1  $\mu$ l 用いた。トランスフェクション後、37°Cで3日間 CO<sub>2</sub>インキュベーター（5% CO<sub>2</sub>）中で培養した。得られた培養液の脂肪細胞形成抑制活性を、以下の方法により測定した。

#### iv) 脂肪細胞形成抑制活性の測定

脂肪細胞形成抑制活性測定は、Kodama H. らの方法（Journal of Cellular Physiology, Vol.112, p83 (1982)）に従い、以下の方法により行った。即ち、マウス前駆脂肪細胞株MC3T3-G2/PA6細胞（RIKEN GENE BANK, RCB1127）を標的細胞として用い、デキサメタゾン存在下での脂肪細胞の形成をトリグリセライドの蓄積を指標として試験し、その抑制活性を測定した。96ウェルマイクロプレートに10%牛胎児血清を含む $\alpha$ -MEM（ギブコ BRL社）で希釈したサンプル（実施例1-iii）で得られた培養液、ベクターのみを導入した細胞の培養液、及び293-EBNA細胞のみの培養液）50  $\mu$ l を入れ、マウス前駆脂肪細胞株MC3T3-G2/PA6細胞  $3 \times 10^3$  個を50  $\mu$ l の  $2 \times 10^{-7}$ Mデキサメタゾン及び10%牛胎児血清を含む $\alpha$ -MEMに懸濁さ

せて播種し、5 %CO<sub>2</sub>、37℃、湿度 100%にて一週間培養した。培養 7 日後に培地を吸引除去し、風乾後、脂肪細胞中に蓄積したトリグリセライドをトリグリセライド測定キット（トリグリセライド G-テストワコー、コード番号 274-69802、和光純薬工業社）を用いて測定した。この時、OD510nm の減少を脂肪細胞形成抑制活性として評価した。結果を第 1 表に示す。この結果、得られた培養液中のスタンニオカルシンが、脂肪細胞形成抑制活性を有することが確認された。

第 1 表

希 釈 率	1/4	1/8	1/16	1/32
STC 遺伝子導入細胞培養液	0.061	0.060	0.057	0.054
ベクター導入細胞培養液	0.036	0.021	0.009	0.007
293-EBNA細胞培養液	0.032	0.017	0.014	0.011

## 実施例 2

### マウス前駆脂肪細胞株 3T3/L1 細胞を用いた脂肪細胞形成抑制活性の測定

マウス前駆脂肪細胞株 3T3-L1 細胞（ATCC 寄託 - 受託番号 CL173）を標的細胞として用い、デキサメタゾンと 1-メチル-3-イソブチルキサンチン存在下での脂肪細胞の形成をトリグリセライドの蓄積を指標として試験し、その抑制活性を測定することによって、脂肪細胞形成抑制活性を評価した。即ち、96 ウェルマイクロプレートに 10% 牛胎児血清を含む  $\alpha$ -MEM（ギブコ BRL 社）で希釈した実施例 1 と同様のサンプル 50  $\mu$ l を入れ、マウス前駆脂肪細胞株 3T3-L1 細胞  $5 \times 10^3$  個を 50  $\mu$ l の  $4 \times 10^{-7}$  M デキサメタゾン、 $2 \times 10^{-5}$  M 1-メチル-3-イソブチルキサンチン及び 10% 牛胎児血清を含む  $\alpha$ -MEM に懸濁させて播種し、5 %CO<sub>2</sub>、37℃、湿度 100%にて一週間培養した。培養 7 日後に培地を吸引除去し、風乾後、脂肪細胞中に蓄積したトリグリセライドをトリグリセライド測定キット（トリグリセライド G-テストワコー、コード番号 274-69802、和光純薬工業社）を用い

て測定した。この時、OD510nm の減少を脂肪細胞形成抑制活性として評価した。結果を第 2 表に示す。この結果、3T3-L1細胞を標的細胞として用いた場合にも、実施例 1 と同様に、培養液中のスタンニオカルシンが、脂肪細胞形成抑制活性を有することが確認された。

第 2 表

希 釈 率	1/4	1/8	1/16	1/32
STC 遺伝子導入細胞培養液	0.081	0.083	0.082	0.083
ベクター導入細胞培養液	0.026	0.017	0.012	0.011
293-EBNA細胞培養液	0.021	0.004	0.006	0.016

### 実施例 3

#### 製剤例

##### 製剤例 1：注射剤の製造

実施例 1 で得られたスタンニオカルシン1mg とヒト血清アルブミン50mgを0.01 Mリン酸緩衝液（PBS、pH7.0）100ml に溶解し、滅菌後バイアル瓶に2ml ずつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

##### 製剤例 2：注射剤の製造

実施例 1 で得られたスタンニオカルシン50mg、ツイーン 80 1mg、及びヒト血清アルブミン50mgを0.01M リン酸緩衝液（PBS、pH7.0）100ml に溶解し、滅菌後バイアル瓶に5ml ずつ分注したものを凍結乾燥後密封した。

##### 製剤例 3：注射剤の製造

実施例 1 で得られたスタンニオカルシン100mg、ヒト血清アルブミン50mg、及びソルビトール4gを0.01M リン酸緩衝液（PBS、pH7.0）20mlに溶解し、滅菌後バイアル瓶に2mlずつ分注したものを凍結乾燥後密封した。



産業上の利用可能性

本発明により、スタンニオカルシンを有効成分とする新規な肥満予防及び／又は治療剤が提供される。本発明製剤は、肥満に対する優れた予防及び／又は治療効果を有し、医薬として有用である。

寄託された微生物への言及

イ. 当該微生物を寄託した寄託機関の名称及びあて名

名 称：日本国通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

あて名：日本国茨城県つくば東 1 丁目 1-3(郵便番号 305-8566)

ロ. イの機関に寄託した日付

平成11年 5 月31日（平成10年 8 月11日に寄託された微工研菌寄第P-16933号より移管）

ハ. イの機関の寄託について付した寄託番号

FERM BP-6736

請 求 の 範 囲

1. スタンニオカルシン (Stanniocalcin)を有効成分とする、肥満予防及び／又は治療剤。

[配列表]

SEQUENCE LISTING

<110> Snow Brand Milk Products Co., Ltd.

<120> 肥満予防及び／又は治療剤

<130> SNOW-128

<160> 4

<210> 1

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized DNA

<400> 1

GGGGCTAGCC AACAACTTAG CGGAAACTT

29

<210> 2

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized DNA

<400> 2

CCCCTCGAGT GTGTCAACAC CCCTAAAAT

29

<210> 3

<211> 741

<212> DNA

<213> Human

<300>

<301> Olsen H. S. et al.

<302> Human stanniocalcin : a possible hormonal regulator of mineral metabolism.

<303> Proc. Natl. Acad. Sci. USA

<304> 93

<305> 5

<306> 1792

<307> 1996-03-05

<308> GenBank, U46768

<309> 1996-02-22

<400> 3

atgctccaaa actcagcagt gcttctgggtg ctggatgatca gtgcttctgc aacccatgag 60

gcggagcaga atgactctgt gagccccagg aaatcccgag tggcggccca aaactcagct 120  
gaagtgggttc gttgcctcaa cagtgtctcta caggtcggct gcggggcttt tgcattgcctg 180  
gaaaactcca cctgtgacac agatgggatg tatgacatct gtaaattcctt cttgtacagc 240  
gctgctaaat ttgacactca gggaaaagca ttcgtcaaag agagcttaaa atgcatcgcc 300  
aacgggggtca cctccaaggt cttcctcgcc attcggaggt gctccacttt ccaaaggatg 360  
attgctgagg tgcaggaaga gtgctacagc aagctgaatg tgtgcagcat cgccaagcgg 420  
aaccctgaag ccatcactga ggtcgtccag ctgcccaatc acttctccaa cagatactat 480  
aacagacttg tccgaagcct gctggaatgt gatgaagaca cagtcagcac aatcagagac 540  
agcctgatgg agaaaattgg gcctaacatg gccagcctct tccacatcct gcagacagac 600  
cactgtgccc aaacacaccc acgagctgac ttcaacagga gacgcaccaa tgagccgcag 660  
aagctgaaag tcctcctcag gaacctccga ggtgaggagg actctccctc ccacatcaaa 720  
cgcacatccc atgagagtgc a 741

<210> 4

<211> 247

<212> PRT

<213> Human

<300>

<301> Olsen H. S. et al.

<302> Human stanniocalcin : a possible hormonal regulator of mineral metabolism.

<303> Proc. Natl. Acad. Sci. USA

<304> 93

<305> 5

<306> 1792

&lt;307&gt; 1996-03-05

&lt;400&gt; 4

Met Leu Gln Asn Ser Ala Val Leu Leu Val Leu Val Ile Ser Ala Ser  
5 10 15  
Ala Thr His Glu Ala Glu Gln Asn Asp Ser Val Ser Pro Arg Lys Ser  
20 25 30  
Arg Val Ala Ala Gln Asn Ser Ala Glu Val Val Arg Cys Leu Asn Ser  
35 40 45  
Ala Leu Gln Val Gly Cys Gly Ala Phe Ala Cys Leu Glu Asn Ser Thr  
50 55 60  
Cys Asp Thr Asp Gly Met Tyr Asp Ile Cys Lys Ser Phe Leu Tyr Ser  
65 70 75 80  
Ala Ala Lys Phe Asp Thr Gln Gly Lys Ala Phe Val Lys Glu Ser Leu  
85 90 95  
Lys Cys Ile Ala Asn Gly Val Thr Ser Lys Val Phe Leu Ala Ile Arg  
100 105 110  
Arg Cys Ser Thr Phe Gln Arg Met Ile Ala Glu Val Gln Glu Glu Cys  
115 120 125  
Tyr Ser Lys Leu Asn Val Cys Ser Ile Ala Lys Arg Asn Pro Glu Ala  
130 135 140  
Ile Thr Glu Val Val Gln Leu Pro Asn His Phe Ser Asn Arg Tyr Tyr  
145 150 155 160  
Asn Arg Leu Val Arg Ser Leu Leu Glu Cys Asp Glu Asp Thr Val Ser  
165 170 175  
Thr Ile Arg Asp Ser Leu Met Glu Lys Ile Gly Pro Asn Met Ala Ser

180 185 190  
Leu Phe His Ile Leu Gln Thr Asp His Cys Ala Gln Thr His Pro Arg  
195 200 205  
Ala Asp Phe Asn Arg Arg Arg Thr Asn Glu Pro Gln Lys Leu Lys Val  
210 215 220  
Leu Leu Arg Asn Leu Arg Gly Glu Glu Asp Ser Pro Ser His Ile Lys  
225 230 235 240  
Arg Thr Ser His Glu Ser Ala  
245

Patent Application No. 263004/1998

【Document Name】 Patent Application

【File Number】 YTP98014

【Filing Date】 17 September, 1998

【Address】 Commissioner of Patent Office  
Kenji ISAYAMA Esquire

【Title of the Invention】

Preventive and/or Therapeutic Agent for  
Obesity

【Number of claims】 1

【Inventor】

【Address or Residence】

456-1, Shimokoyama, Ishibashi-machi,  
Shimotsuga-gun, Tochigi

【Name】 Masaaki GOTO

【Inventor】

【Address or Residence】

SK-Mansion 3-E, 1-3-3, Omatsuyama,  
Ishibashi-machi, Shimotsuga-gun, Tochigi

【Name】 Akihiro TOMOYASU

【Inventor】

【Address or Residence】

Lionsgarden Higashiomiya 1-524, 702-12,  
Shimacho, Omiya-shi, Saitama

【Name】 Kyoji YAMAGUCHI

【Inventor】

【Address or Residence】

53-8, Yuukigaoka, Kaminokawa-machi,



Kawachi-gun, Tochigi

【Name】 Masahiko KINOSAKI

【Inventor】

【Address or Residence】

Nishiura-heights 2-4, 578-15 Ishibashi,  
Ishibashi-machi, Shimotsuga-gun, Tochigi

【Name】 Nobuaki NAKAGAWA

【Applicant】

【Code Number】 000006699

【Name】 SNOW BRAND MILK PRODUCTS CO., LTD.

【Representative】 Tetsuro ISHIKAWA

【Charge】

【Method of Payment】 Deposit

【Deposit Number】 030166

【Amount of Payment】 ¥21,000

【List of Submission】

【Name of Submission】 Specification 1

【Name of Submission】 Abstract 1

【Proof】 Need

【Document Name】 Specification  
【Title of the Invention】 PREVENTIVE AND/OR THERAPEUTIC AGENT  
FOR OBESITY

【Claims】

【Claim 1】 A preventive and/or therapeutic agent for obesity which contains stanniocalcin as an effective ingredient.

【Detailed Description of the Invention】

【0001】

【Technical Field where the Invention Belongs】

The present invention relates to a novel preventive and/or therapeutic agent for obesity which contains stanniocalcin as an effective ingredient. A pharmaceutical preparation of the present invention has excellent preventive and/or therapeutic effects for obesity and is useful as a pharmaceutical.

【0002】

【Background Art】

Obesity is a risk factor of diseases such as diabetes mellitus, hypertonia, and heart disease, which threaten health of people in advanced countries. Obesity means physical conditions wherein adipose tissues have abnormally accumulated. Adipose tissues are special organs wherein surplus in vivo energies are stored as fat or triglyceride, and constructed of fibroblasts including adipocytes and their precursors, macrophages, blood vessel surrounding cells, blood cells, and the like.

Adipocytes are said to amount from 1/3 to 2/3 of cells which are present in adipose tissues and to accumulate fats or triglycerides therein. Adipocytes differentiate and mature through the process starting from mesenchymal multipotent stem cells, and growing into lipoblasts which have acquired a base as adipocytes, precursor adipocytes with no lipid droplets but having initial markers of adipocytes, immatured adipocytes containing lipid droplets, and finally into matured adipocytes containing a large quantity of accumulated fats. Adipocytes of adults suffering from slight obesity hypertrophically grow due to increase in the amount of

accumulated fats or triglycerides. Number of adipocytes increases as the degree of obesity becomes conspicuous. Therefore, it is expected to stop progress of obesity and to treat obesity by decreasing the number of adipocytes by controlling differentiation and maturation or by suppressing the increase in the amount of accumulated fats by means of suppressing hypertrophia of matured adipocytes. Control of in vivo adipocyte differentiation has been proven to undergo either positively or negatively according to a number of factors derived from environmental factors such as ingestion, exercise, and so on. As cytokines which control differentiation of adipocytes from adipocyte precursors, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ : Torti F. M. et al., Science, Vol. 229, p 867 (1985)), transforming growth factor- $\beta$  (Ignotz R. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 82, p 8530 (1985)), preadipocyte factor-1 (Pref-1: Smas C.M. et al., Cell, Vol. 73, p 725 (1993)), and the like have been reported. In addition, leptin, the translational protein of an ob gene which has recently been cloned, has been reported to possibly decrease the intake amount and the weight of adipose tissues via central nerve system (Levin N. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 93. P.1726, 1996). Furthermore, intracerebral peptide-neuropeptide Y which exhibits a strong appetite stimulating effect and its receptor are gathering attention as materials for the development of an obesity suppressing pharmaceutical (Sainsburg A. et al, Diabetologia, Vol.39, p353, 1996). These cytokines are expected to become a therapeutic agent for obesity due to depressing action on accumulation of fat in their adipocyte. Clinical tests as an obesity therapeutic or preventive agent is ongoing on some of these cytokines such as leptin.

At present, one obesity therapeutic or preventive agent is commercially available in the USA under the Redux<sup>TM</sup> (American Home Products Co.). Other drugs such as Meridia (Kunol Co.) and Xenical (Roche Co.) will be approved as an obesity treating agent or a fat absorption inhibitor in the USA. The treatments method using these pharmaceuticals, however, are not necessarily satisfactory in the

effects and therapeutic results. Development of a new agent which is available exhibits for these pharmaceuticals higher curative effect and less side effect usable have been desired.

【0003】

【Problems to be Solved by the Invention】

In view of the above circumstances, the present inventors have intensive investigated a substance which shows anti-obesity activity or obesity-curing activity, and as a result, found that stanniocalcin which is known as a protein controlling metabolism of minerals (Olsen H.S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 93, p 1792 (1996)), exhibits adipogenesis inhibitory activity, or inhibitory activity of differentiation and/or maturation of adipocytes. Accordingly, the object of the present invention is to provide a preventive and/or therapeutical agent for obesity containing stanniocalcin as an effective ingredient.

【0004】

【Means to Solve the Problems】

The present invention relates to a preventive and/or therapeutical agent for obesity, which contains stanniocalcin as an effective ingredient. The pharmaceutical preparation according to the present invention can exhibit excellent preventive and/or therapeutic effects for obesity and are useful as a pharmaceutical.

【0005】

【Embodiments of the Invention】

Stanniocalcin, or the effective ingredient according to the present invention, can be obtained by the method of Olsen H. S. et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 93, p 1792 (1996)). Specifically, the above-described literature reference or gene bank or the like can be searched to learn the sequence of cDNA of stanniocalcin, and based on the sequence information, stanniocalcin cDNA can be obtained using the PCR method etc.. The stanniocalcin expression cell can be obtained by transfections of the expression vector inserted the resultant cDNA into animal cell etc.. Then, stanniocalcin can be obtained by cultivating the resultant

stanniocalcin expression cells, followed by purification of the resultant culture solution by conventionally employed procedures.

【0006】

The adipogenesis inhibitory activity can be determined by estimating the suppression effects of adipogenesis induced by dexamethasone with retardation of triglyceride accumulation using mouse preadipocytic cell as a target according to the method of Kodama H. et al. (Journal of Cellular Physiology, Vol. 112, p 83 (1982)).

【0007】

Stanniocalcin, or the effective ingredient of the present invention, can be safely administered to human being and animals in the form of pharmaceutical compositions intended for use in the prevention and/or treatment of obesity. Stanniocalcin can be made into pharmaceutical preparations and administered either for orally or parenterally. Examples of the pharmaceutical composition include compositions for injection, compositions for dripping, suppositories, nasal agent, sublingual agent, percutaneous absorption agent, and the like. These pharmaceutical preparations may be formulated according to known pharmaceutical preparation methods using pharmaceutically acceptable carriers, excipients, stabilizers, coloring matters, surfactants and other additives, and made into target preparations. In the case of compositions for injection, a pharmacologically effective amount of stanniocalcin, which is the effective ingredient of the present invention, may be mixed with pharmaceutically acceptable excipients/activators, such as amino acids, sugars, cellulose derivatives and other organic/inorganic compounds, which may be generally added to compositions for injection. Furthermore, optionally adding pH-control agent, buffering agent, stabilizer, solubilizer, and the like, various pharmaceuticals for injection may be obtainable by conventionally employed procedures.

【0008】

【Example】

Examples given in the below describe the present invention in more detail, whereby these examples are merely illustrative, and the present invention is in no way understood to be limited by them.

【0009】

【Example 1】

Production of stanniocalcin

i) Isolation of poly(A)<sup>+</sup> RNA from IMR-90 cells

About 10 µg of poly(A)<sup>+</sup> RNA was isolated from  $1 \times 10^8$  of IMR-90 cells using Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen Inc.) according to the protocol of Invitrogen Inc..

【0010】

ii) Construction of human stanniocalcin expression vector

A single-stranded cDNA was synthesized using Super-Script II cDNA synthesis Kit (Gibco BRL Inc.) and 1 µg of the isolated poly(A)<sup>+</sup> RNA used as a template, according to the protocol of Gibco BRL Inc.. Stanniocalcin (STC) cDNA fragment was obtained by carrying out PCR using the obtained cDNA, primer STCF1N (Sequence Identification No. 1) and primer STCR1Xh (Sequence Identification No. 2). The condition of PCR is as follows:

10X Ex Taq Buffer (Takara Shuzo Co.)	10 µl
2.5 mM dNTP	8 µl
cDNA solution	1 µl
Ex Taq (Takara Shuzo Co.)	0.5 µl
Distilled water	74.5 µl
20 µM Primer STCF1N	5 µl
100 µM Primer STCR1Xh	1 µl

The above-described solutions were mixed in a microcentrifugal tube, and PCR was performed under the following conditions: after pretreatment at 95°C for 3 min, the reaction of the three steps of at 95°C for 30 sec, at 55°C for 30 sec and at

72°C for 2 min was repeated 30 times. Then, the reaction mixture was incubated at 70°C for 5 min. A portion of the reaction mixture was subjected to agarose gel electrophoresis, and it was confirmed that a uniform DNA fragment of about 900 bp was obtained. The fragment was sequenced by the conventional method, and it was confirmed that the cDNA encoding stanniocalcin was obtained. The cDNA sequence and the amino acid sequence are shown in Sequence Identification Nos. 3 and 4, of sequence table respectively.

The resultant DNA fragment of about 900 bp was purified using QIAEXII DNA extraction kit (QIAGEN Inc.), and the purified DNA fragment was cleaved by restriction enzymes XhoI and NheI (Takara Shuzo Co.) and purified using QIAEXII DNA extraction kit (STC XhoI-NheI fragment). Plasmid pCEPSTC was obtained by ligating the STC XhoI-NheI fragment to pCEP4 (Invitrogen Inc.) cleaved by XhoI and NheI by ligation kit ver. 2 (Takara Shuzo Co.). The plasmid contained DNA encoding stanniocalcin. *E. coli* (DH5  $\alpha$  ; Gibco BRL Inc.) containing the plasmid has been deposited, in the name of DH5 $\alpha$ /pCEP-STC and under Accession No. FERM P-16933 in National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, The Ministry of International Trade and Industry, on August 11, 1998. No erroneous uptake of bases in the DNA portion derived from PCR during the DNA synthesis was meanwhile confirmed by DNA sequencing.

[0011]

iii) Expression of human stanniocalcin

*E. coli* DH5 $\alpha$  having pCEPSTC as obtained in Example 1-ii) was cultivated with shaking in 2 ml of Terrific Broth (Life Technologies Inc.) containing 50  $\mu$ g/ml of ampicillin (Sigma Inc.) and 4.7 % of glycerol at 37°C overnight, and the plasmid DNA was purified from the bacterial cells using QIAWELL kit (QIAGEN Inc.). 293-EBNA cells (Invitrogen Inc.) were seeded in IMDM (Life Technologies Inc.) containing 10 % of fetal bovine serum in each well of 24-well plate to  $2 \times 10^5$  /well/ml, followed by cultivation in a CO<sub>2</sub> incubator (5% CO<sub>2</sub>) at 37°C overnight. pCEPSTC or pCEP4 was transfected to 293-EBNA

cells using Eugene 6 (Behringer Mannheim Co.). DNA and Eugene 6 were used in a amount of 0.5  $\mu$ g and 1  $\mu$ l, respectively. After transfection, the transfected cells were cultivated in a CO<sub>2</sub> incubator (5% CO<sub>2</sub>) at 37°C for 3 days. The resultant culture solution was assayed for adipogenesis inhibitory activity by the procedure described below.

【0012】

iv) Determination of adipogenesis inhibitory activity

Adipogenesis inhibitory activity was determined by the following procedure according to the method of Kodama H. et al. (Journal of Cellular Physiology, Vol. 112, p 83 (1982)): that is, using mouse pre-adipocytic cell strain MC3T3-G2/PA6 (RIKEN GENE BANK, RCB1127) as a target cell, the adipogenesis induced by dexamethasone was determined with triglyceride accumulation as an index of its inhibitory activity. 50  $\mu$ l of the sample (the culture solution obtained from Example 1-iii), the culture solution of cells having the vector alone transfected, and the culture solution of pure 293-EBNA cells), which were diluted with  $\alpha$ -MEM (Gibco BRL Inc.) containing 10 % of fetal bovine serum, were distributed into each 96-well microplate, and  $3 \times 10^3$  cells of pre-adipocytic cell strain MC3T3-G2/PA6 were suspended in 50  $\mu$ l of  $\alpha$ -MEM containing  $2 \times 10^{-7}$  M of dexamethasone and 10 % of fetal bovine serum, and then were seeded, followed by cultivation at 5% CO<sub>2</sub>, 37°C and 100% humidity for one week. After cultivation for 7 days, the culture medium was removed by aspiration, then air-dried and assayed for the triglyceride accumulated in adipocytes By using a triglyceride measuring kit (Triglyceride G-Test Wako, Code No. 274-69802, Wako Pure Chemicals Ind. Co.). The decreases at OD 510 nm were used for assessment of adipogenesis inhibitory activity. The obtained results are shown in Table 1. As the result, stanniocalcin in the resultant culture solution was confirmed to exhibit adipogenesis inhibitory activity.

【0013】

【Table 1】



Dilution Ratio	1/4	1/8	1/16	1/32
Culture solution of STC gene-transfected cells	0.061	0.060	0.057	0.054
Culture solution of vector-transfected cells	0.036	0.021	0.009	0.007
Culture solution of 293-EBNA cells	0.032	0.017	0.014	0.011

【0014】

【Example 2】

Determination of adipogenesis inhibitory activity by using 3T3/L1 cells

Using mouse pre-adipocytic cell strain 3T3-L1 (deposited as ATCC-Accession No. CL173) as a target cell, the formation of adipocytes induced by dexamethasone and 1-methyl-3-isobutylxanthine was measured by means of triglyceride accumulation as an index of its inhibitory activity, to evaluate the suppressing activity against adipocyte formation. Specifically, 50  $\mu$ l of a sample equivalent to the one in Example 1 diluted with  $\alpha$ -MEM (Gibco BRL Inc.) containing 10 % of fetal bovine serum was placed into a 96-well microplate, and  $5 \times 10^3$  cells of mouse pre-adipocyte strain 3T3-L1 were suspended in 50  $\mu$ l of  $\alpha$ -MEM containing  $4 \times 10^{-7}$  M of dexamethasone,  $2 \times 10^{-5}$  M of 1-methyl-3-isobutylxanthine and 10 % of fetal bovine serum and then seeded, followed by cultivation at 5% CO<sub>2</sub>, 37°C and 100% humidity for one week. After cultivation for 7 days, the culture medium was removed by aspiration, and the cells were air-dried to measure the triglyceride accumulated in adipocytes using a triglyceride assay kit (Triglyceride G-Test Wako, Code No. 274-69802, Wako Pure Chemicals Ind. Co.). The decrease of OD at 510 nm was taken as adipogenesis inhibitory activity. The obtained results are shown in Table 2. As a result, stanniocalcin in the culture solution was confirmed to exhibit adipogenesis inhibitory activity, as in

Example 1, when 3T3-L1 cells are used as a target.

【0015】

【Table 2】

Dilution Ratio	1/4	1/8	1/16	1/32
Culture solution of STC gene-transfected cells	0.081	0.083	0.082	0.083
Culture solution of vector-transfected cells	0.026	0.017	0.012	0.011
Culture solution of 293-EBNA cells	0.021	0.004	0.006	0.016

【0016】

【Effects of the Invention】

According to the present invention, there is provided a novel preventive and/or therapeutic agent for obesity, which contains stanniocalcin as an effective ingredient. The pharmaceutical preparation of the present invention can exhibit excellent preventive and/or therapeutic effects against obesity and is useful as a pharmaceutical.

[0017]

[Sequence List]

SEQUENCE LISTING

<110> Snow Brand Milk Products Co., Ltd.

<120> Preventive and/or Therapeutic Agent for Obesity

<130> YTP98014

<160> 4

<210> 1

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized DNA

<400> 1

GGGGCTAGCC AACAACTTAG CGGAAACTT

29

<210> 2

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized DNA

<400> 2

CCCCTCGAGT GTGTCAACAC CCCTAAAAT

29

<210> 3

<211> 741

<212> DNA

<213> Human

<300>

<301> Olsen H. S. et al.

<302> Human stanniocalcin : a possible hormonal regulator of mineral metabolism.

<303> Proc. Natl. Acad. Sci. USA

<304> 93

<305> 5

<306> 1792

<307> 1996-03-05

<308> GenBank, U46768

<309> 1996-02-22

<400> 3

```
atgctccaaa actcagcagt gcttctggtg ctggtgatca gtgcttctgc aacccatgag 60
gcgagcaga atgactctgt gagccccagg aaatccccgag tggcgcccca aaactcagct 120
gaagtgggtc gttgcctcaa cagtgtctta caggctcggct gcggggcttt tgcattgctg 180
gaaaactcca cctgtgacac agatgggatg tatgacatct gtaaatcctt cttgtacagc 240
gctgctaaat ttgacactca gggaaaagca ttctgcaaag agagcttaaa atgcatcgcc 300
aacgggggtc cctccaaggt cttcctcgcc attcggagggt gctccacttt ccaaaggatg 360
attgctgagg tgcaggaaga gtgctacagc aagctgaatg tgtgcagcat cgccaagcgg 420
aacctgaag ccactactga ggtcgtccag ctgccaatc acttctccaa cagatactat 480
aacagacttg tccgaagcct gctggaatgt gatgaagaca cagtcagcac aatcagagac 540
agcctgatgg agaaaattgg gcctaacatg gccagcctct tccacatcct gcagacagac 600
cactgtgcc aaacacaccc acgagctgac ttcaacagga gacgcaccaa tgagccgcag 660
aagctgaaag tcctcctcag gaacctcga ggtgaggagg actctcctc ccacatcaaa 720
cgcacatccc atgagagtgc a 741
```

<210> 4

<211> 247

<212> PRT

<213> Human

<300>

<301> Olsen H. S. et al.

<302> Human stanniocalcin : a possible hormonal regulator of mineral metabolism.

<303> Proc. Natl. Acad. Sci. USA

<304> 93

<305> 5

<306> 1792

<307> 1996-03-05

<400> 4

Met Leu Gln Asn Ser Ala Val Leu Leu Val Leu Val Ile Ser Ala Ser

5 10 15

Ala Thr His Glu Ala Glu Gln Asn Asp Ser Val Ser Pro Arg Lys Ser

20 25 30

Arg Val Ala Ala Gln Asn Ser Ala Glu Val Val Arg Cys Leu Asn Ser

35 40 45

Ala Leu Gln Val Gly Cys Gly Ala Phe Ala Cys Leu Glu Asn Ser Thr

50 55 60

Cys Asp Thr Asp Gly Met Tyr Asp Ile Cys Lys Ser Phe Leu Tyr Ser

65 70 75 80

Ala Ala Lys Phe Asp Thr Gln Gly Lys Ala Phe Val Lys Glu Ser Leu

85 90 95

Lys Cys Ile Ala Asn Gly Val Thr Ser Lys Val Phe Leu Ala Ile Arg

100 105 110

Arg Cys Ser Thr Phe Gln Arg Met Ile Ala Glu Val Gln Glu Glu Cys

115 120 125

Tyr Ser Lys Leu Asn Val Cys Ser Ile Ala Lys Arg Asn Pro Glu Ala

130 135 140

Ile Thr Glu Val Val Gln Leu Pro Asn His Phe Ser Asn Arg Tyr Tyr

145 150 155 160

Asn Arg Leu Val Arg Ser Leu Leu Glu Cys Asp Glu Asp Thr Val Ser

165

Thr Ile Arg Asp Ser Leu Met Glu Lys Ile Gly Pro Asn Met Ala Ser

180

Leu Phe His Ile Leu Gln Thr Asp His Cys Ala Gln Thr His Pro Arg

195

Ala Asp Phe Asn Arg Arg Arg Thr Asn Glu Pro Gln Lys Leu Lys Val

210

Leu Leu Arg Asn Leu Arg Gly Glu Glu Asp Ser Pro Ser His Ile Lys

225

Arg Thr Ser His Glu Ser Ala

245

[Document Name]                      Abstract

[Abstract]

[Problem]                              To provide a preventive and/or therapeutic agent for obesity.

[Means to be solved]

                                        The preventive and/or therapeutic agent for obesity is contained contains stanniocalcin as an effective ingredient.

[Effect]                              The pharmaceutical preparation of the present invention can exhibit excellent preventive and/or therapeutic effects against obesity and is useful as a pharmaceutical.

[Drawing]                              Non